

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Кордюковой Ларисы Валентиновны на диссертационную работу Плотниковой Марины Александровны на тему «Мультиплексные методы определения вирус-индуцированной экспрессии цитокинов на основе микрочипов и ПЦР», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

АКТУАЛЬНОСТЬ ИЗБРАННОЙ ТЕМЫ. Грипп – это острое респираторное заболевание вирусной природы. Вирус гриппа становится не только причиной сезонной заболеваемости человека и животных, но и приводит к возникновению периодических эпидемий и пандемий. В эпидемические сезоны гриппом заболевает до 10% населения земного шара (примерно 500 млн. чел.), а при возникновении пандемий число заболевших увеличивается в 4-5 раз. Одним из основных путей передачи вируса является воздушно-капельный, что существенно ускоряет его распространение. Некоторые вирусы гриппа, такие как A/H5N1, A/H1N1 1918 года и A/H1N1_{pdm09} могут вызывать серьёзные лёгочные повреждения и воспаления у некоторых пациентов, приводящие к смертельным исходам. Тяжёлое течение болезни и возникающие осложнения при гриппе связывают с явлением «цитокинового шторма» или гиперцитокинемии. Неконтролируемая каскадная гиперпродукция цитокинов при инфекциях, вызываемых вирусами гриппа, приводит к несостоятельности врождённого иммунного ответа организма и ограничению развития специфического иммунитета, что ведёт к нарушению цитокинового баланса.

Изучение уровня цитокинов у пациентов с инфекциями, вызываемыми вирусами гриппа типа А, позволяет своевременно прогнозировать течение заболевания, даёт возможность выбрать специфическую терапевтическую стратегию, корректирующую количественные, качественные и функциональные нарушения цитокиновой регуляции, приводя к лечебному эффекту. В связи с этим не ослабевают актуальность фундаментального

изучения роли цитокинов в патогенезе инфекций, вызываемых вирусами гриппа.

Предметом исследования диссертационной работы является разработка и применение мультиплексных методов выявления вирус-индуцированной экспрессии цитокинов. Необходимость создания мультиплексных методов определения цитокинов обусловлена тем, что, несмотря на явную заинтересованность медицинского сообщества в системах диагностики цитокинов, в настоящее время в России коммерческих наборов подобного рода практически нет. Разработанные в диссертационной работе методы определения экспрессии цитокинов, могут быть применены не только для исследования иммунных свойств клеток при инфекциях, вызванных гриппом, но и для решения более общих фундаментальных и прикладных задач в области вирусологии, эпидемиологии и инфекционной патологии. Это дает основание утверждать, что проблема, сформулированная в диссертации, является важной и актуальной и имеет большое практическое и социально-экономическое значение.

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ. Диссертация Плотниковой М.А. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, раздела собственных исследований и их обсуждений, состоящего из 6-х глав, заключения, выводов и списка литературных источников, включающего 132 наименования. Работа хорошо иллюстрирована, содержит 10 таблиц и 36 рисунков, которые существенно облегчают восприятие сложного многогранного материала.

В обзоре литературы автор информативно представил теоретические предпосылки исследования. Исчерпывающе изложены сведения о цитокинах, их участии в иммунном ответе, особое внимание уделено роли цитокинов при патогенезе гриппа. В обзоре литературы описаны современные методы изучения экспрессии цитокинов, в том числе представлены исчерпывающие сведения о новых технологиях с использованием микрочипов.

В главе, посвященной методическим аспектам работы, подробно описаны использованные в работе методики. Для выполнения всех поставленных задач автором используются классические вирусологические, иммунологические и современные молекулярно-биологические методы исследования, являющиеся адекватными для решения обозначенных задач. Автор демонстрирует владение широким спектром компьютерных программ для первичного анализа нуклеотидных последовательностей и статистического представления результатов. Адекватность статистической обработки полученных данных не вызывает сомнений.

Раздел, содержащий результаты собственных исследований и их обсуждение, представлен на 45 страницах. Большинство результатов, полученных автором, являются оригинальными. Первая глава включает филогенетический анализ гена NS1 штаммов вирусов гриппа, используемых в работе. Следующие главы были посвящены непосредственно разработке мультиплексных тест-систем и применению их для оценки цитокинового статуса при гриппозной инфекции. Важно отметить, что автором были разработаны тест-системы как для оценки уровня мРНК генов цитокинов, так и для количественного анализа их белковых продуктов, что позволяет провести комбинированный анализ экспрессии цитокинов на уровне мРНК и на уровне белка и получить полную картину связанных с цитокинами аспектов протекания инфекционного процесса, вызываемого вирусами гриппа.

Значительная часть исследований посвящена определению спектра цитокинов (мРНК и белков) в клетках A549, инфицированных филогенетически удалёнными штаммами вирусов гриппа различных подтипов, циркулирующих в человеческой популяции.

В диссертационной работе не обнаружены существенные недостатки. Мелкие стилистические ошибки и вольное использование терминологии не портят общего впечатления от работы.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ И ВЫВОДОВ не вызывает сомнений. Они базируются на комплексном

использовании адекватных поставленным задачам современных, хорошо зарекомендовавших себя в исследовательской практике методов молекулярной биологии, вирусологии и иммунологии. Полученные диссертантом результаты критически анализируются и обосновываются с учетом существующих в современной литературе сведений о взаимодействии вируса гриппа с клеткой-хозяином. Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования и являются корректными.

ДОСТОВЕРНОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ обусловлена адекватным статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Разработанные собственные оригинальные методики при конструировании тест-систем на основе микрочипов апробированы на практике при использовании различных модельных клеточных систем. Полученные в ходе исследования экспериментальные данные согласуются с результатами других исследователей, расширяют и дополняют сведения о цитокиновом статусе клеток, инфицированных различными штаммами вируса гриппа. Достоверность результатов, полученных соискателем, также подтверждается наличием 17-ти печатных работ по теме диссертации, из которых 5 работ опубликованы в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией.

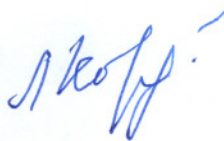
ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ ДЛЯ ТЕОРИИ И ПРАКТИКИ. Основные результаты и выводы работы являются важными для развития нескольких научных направлений, таких как вирусология, молекулярная биология, а также для практического здравоохранения. В процессе выполнения исследования разработан не имеющий прямых аналогов количественный метод детекции мРНК цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 β , ИЛ-18, ИФН- γ и ФНО- α человека с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Впервые в России разработан белковый микрочип для количественной детекции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ИФН- γ и ФНО- α человека и олигонуклеотидный микрочип для оценки мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-

10, ИЛ-12β, ИЛ-18, ИФН-γ и ФНО-α человека. Тест-системы, разработанные автором, могут быть использованы научными коллективами при проведении различных исследований в области вирусологии и иммунологии. Полученные лабораторные образцы диагностических систем могут стать основой для коммерческого производства. Сравнение технических характеристик показало, что разработанные тест-системы находятся на уровне аналогичных тест-систем, предлагаемых ведущими мировыми производителями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. По актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов работа М.А. Плотниковой полностью отвечает требованиям п.9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Соискатель Плотникова Марина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Ведущий научный сотрудник
отдела хроматографического анализа
НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
ФГБОУ высшего профессионального
образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ),
д.б.н.



Л.В. Кордюкова

Подпись д.б.н. Л.В. Кордюковой заверяю
Зав. канцелярией



Н.Н. Сидорова

Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского МГУ,
академик РАН



В.Л. Скулачев